



TITLE:

タンパク質結晶-溶液界面における タンパク質1分子の拡散・吸着・脱 離ダイナミクス (異常拡散の数理)

AUTHOR(S):

佐崎, 元

CITATION:

佐崎, 元. タンパク質結晶-溶液界面におけるタンパク質1分子の拡散・
吸着・脱離ダイナミクス (異常拡散の数理). 数理解析研究所講究録
2013, 1854: 10-22

ISSUE DATE:

2013-10

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/195203>

RIGHT:

タンパク質結晶-溶液界面におけるタンパク質 1 分子の

拡散・吸着・脱離ダイナミクス

北海道大学低温科学研究所 佐崎 元

Gen Sasaki

Institute of Low Temperature Science,

Hokkaido University

sasaki@lowtem.hokudai.ac.jp

1. はじめに

結晶は多数の原子や分子が規則的に配列した固体であり、結晶化の駆動力がそれほど大きくない場合には、その表面は低指数（ファセット）面で囲まれている。そして結晶を構成する分子（原子）層が一層つつ横方向に成長することで、結晶は厚みを増してゆく。その素過程を図 1 に示す。環境相からやって来た結晶の構成分子は、まず分子レベルで平坦なテラスに吸着し、表面拡散する。結晶表面上の吸着原子は、表面での滞在時間中に、結晶を構成する分子層の成長端（ステップと呼ばれる）上のキンクにたどり着くと、結晶相に取り込まれる。一方、滞在時間中にキンクにたどり着けなかった分子は、テラスから脱離し、環境相へと帰ってゆく。このような成長素過程は、気相から成長する結晶の表面では、走査型プローブ顕微鏡などを用いた多くの研究によって明らかにされて来た。しかしながら、溶液から成長する結晶の表面では、個々の単位ステップの前進についてはこれまでに多くの観察実験があるが（総説参照 (1)）、溶液と結晶との界面において個々の分子の拡散や吸着・脱離については、著者らが最近直接観察に成功するまでは、全く観察例がなかった。これまでそのための方法が提案されて来なかったためである。そのため、電気二重層や溶媒和・脱溶媒和など、様々な重要かつ未解明な現象の宝庫である「溶液と結晶の界面」における個々の分子の挙動については、研究はまだ始まったばかりである。

固体表面を分子・原子レベルで直接観察するには、現在、走査型プロ

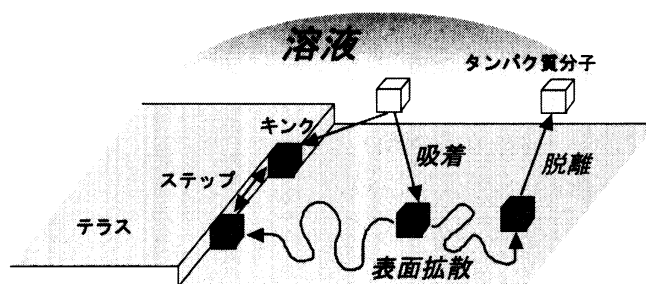


図 1 結晶が層状成長する素過程.

一歩顕微鏡が最もよく用いられる。しかしながら、Van Driessche ら(2)が最近示したように、探針による走査が溶液を攪拌するため、溶液-結晶界面での溶質の濃度分布を擾乱するなど、界面での溶液側の柔らかな構造に影響を及ぼしてしまう。そのため、筆者らは、系に完全に非接触である光学顕微技術が有効であると着想した。特に、近年、生物物理学分野で盛んに用いられている、蛍光プローブを利用した蛍光一分子観察法(初論文(3)と総説(4-7)を参照)が有効であると考えた。本稿ではまず、蛍光一分子観察法をどのように溶液-結晶界面での観察に応用したのかについて説明する。そして、その手法を用いて、タンパク質水溶液-タンパク質結晶の界面における、溶質を模擬した蛍光ラベル化タンパク質分子の拡散挙動(8)と吸着・脱離挙動(9)をその場観察した結果を紹介する。

2. 薄液層型斜入射光学系の開発

蛍光一分子観察法の原理は、夜空の星の観察と同じである。個々の分子はもちろん光学的に見ることは出来ないが、個々の分子が蛍光を発すれば、個々の分子を中心として広がる蛍光の輝度分布(ガウス分布に従う)は光学的に観察できる。さらに、十分な輝度の蛍光プローブを用いると、計測した輝度分布をガウス分布でフィッティングすることで、数 nm の精度で分子の位置を決定できる。本研究では、まず、本観察手法をどのように応用すれば、タンパク質溶液-タンパク質結晶界面で蛍光ラベル化したタンパク質分子を観察できるか説明する。

通常の蛍光一分子観察法では、図 2A の様な光学系を用いる。十分な開口数(>1.4)を持つ油浸型対物レンズを用いて、カバーガラスと溶液との界面で蛍光励起用レーザー光を全反射させる。そうするとカバーガラス-溶液界面において厚みが数 100 nm 以下程度の近接場が生成する。そのため、十分な低濃度(≤ 0.1 nM)に調整した蛍光ラベル化分子の溶液を試料として用いると、近接場中に進入したわずかな数の蛍光ラベル化分子のみが励起されるため、図 2B に示したように、個々の蛍光ラベル化分子から発せられる蛍光を直接観察できる。しかし、図 2 に示した光学配置では、タンパク質溶液とタンパク質結晶との界面を観察したことはならない。

そこで、タンパク質溶液とタ

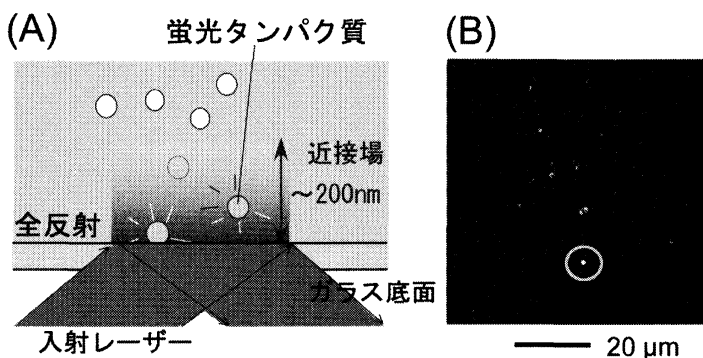


図 2 通常の油浸対物レンズ(開口数 >1.4)を用いた全反射型蛍光一分子観察の光学系(A)および観察例(B)。(B)では、輝点一つが蛍光ラベル化した鶏卵白リゾチーム(F-Hewlett-Packard) 1 分子に相当する。

ンパク質結晶との界面での蛍光一分子観察を実現させるため、まず我々は図 3A に示す光学系を作製した。しかし、この光学系では厚さ数 100 μm のタンパク質結晶を通して界面に焦点を合わせようとしているため、レンズの中心部分と端を通る光が互いに一点で交わらず、「収差」が発生する。そのため、蛍光一分子を可視化することが出来なかった。

収差を十分に解消するためには、図 3B に示したように、タンパク質結晶の厚みが数 10 μm 以下であれば良い。しかし、そのような極めて薄い板状のタンパク質結晶を得ることが実際には困難であったため、我々は図 3C に示した光学系を提案した。すなわち、底面のガラスからタンパク質結晶をわずかに持ち上げた（実際には直径 1 μm のプラスチックビーズをガラス底面に吸着させ、その上に溶液と結晶を配置した）。そして、ガラス底面から 1 μm 離れた溶液-結晶界面に焦点を合わせた。蛍光一分子観察用の対物レンズの焦点深度は約 0.15 μm と大変小さいため、溶液-結晶界面での現象と、底部カバーガラス上での現象は、焦点位置を変えることで十分に切り分けて観察できる。蛍光

励起用のレーザー(波長 532 nm)ビームを、全反射ではなくぎりぎり斜めに入射することで、溶液-結晶界面を照明した。この光学系を用いることで、後に図 5 で示すように、蛍光ラベル化した個々のタンパク質分子を直接観察することに成功した。

3. モデル実験系の構築

溶液と結晶との界面での個々の溶質分子の挙動を調べるにあたり、タンパク質の結晶成長の分野で最も多数の研究が行われている鶏卵白リゾチーム (HEWL: Hen

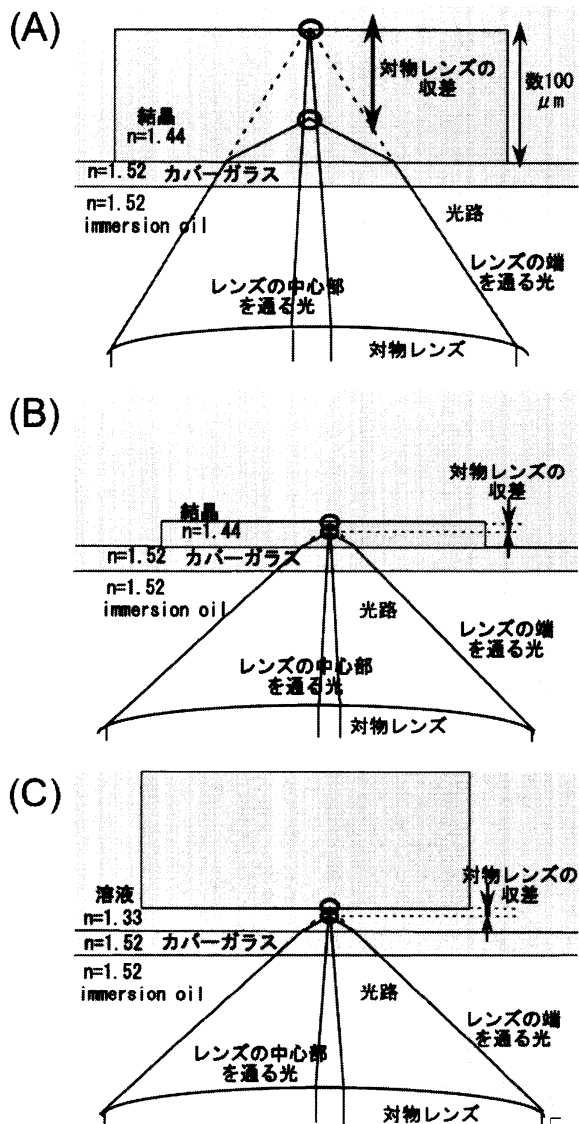


図 3 光学系と収差について。(A) 厚み数 100 μm の結晶表面上の観察。(B) 厚み数 10 μm の結晶表面上の観察。(C) 我々が考案した薄液層型の光学系。

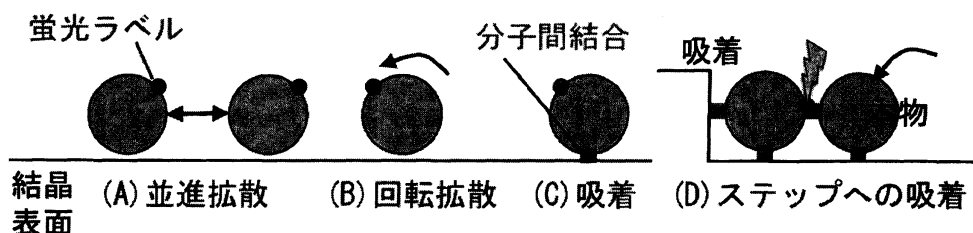


図4 蛍光ラベル化リゾチーム (F-HEWL) 分子の並進拡散 (A), 回転拡散 (B), 吸着 (C), 不純物効果 (D) の模式図 (断面図)。

Egg-White Lysozyme) をモデルタンパク質に選び, その正方晶系結晶に着目した(1). まず, HEWL 分子を蛍光色素 TRITC (tetramethylrhodamin-5-isothiocyanate) でラベル化した. TRITC と HEWL の濃度を様々にかえて反応性を調整することで, HEWL の N 末端アミノ酸 (リジン) のイプシロン-アミノ基のみを蛍光ラベル化することに成功した(10).

このように分子表面の特定の部位のみを蛍光ラベル化した HEWL (以後, F-HEWL と称する) は, 蛍光ラベル化していないネイティブな HEWL の結晶とその溶液との界面上で, 溶質(HEWL)分子を模擬していると言えるだろうか? まず, FITC の分子量は HEWL の分子量(14,307 g/mol)の 3%以下と大変小さいため, 蛍光ラベルは F-HEWL の並進や回転等の分子運動にはほとんど影響を及ぼさない. また, F-HEWL の分子表面の大部分はネイティブの HEWL と同じである. そのため, 図 4A-C に模式的に示したように, F-HEWL は溶液-結晶界面において, 並進や回転の拡散, 吸着にはあまり影響を及ぼさず, 溶質である HEWL 分子を模擬出来ると想定した. 一方, いったん F-HEWL がネイティブな HEWL の結晶表面上のステップ (より正確にはステップ上のキンク) に吸着した後は, 図 4D に示したように, 蛍光ラベルはその後からやってくるネイティブな HEWL と正常な分子間相互作用を取り合うことを妨げる. そのため, F-HEWL はいったん結晶 (ステップやキンク) に取り込まれた後は, 不純物として作用すると考えられる.

この仮定を証明するために, 松井ら(10)は HEWL の正方晶系結晶, 斜方晶系結晶, 単斜晶系結晶, 三斜晶系結晶の成長に及ぼす F-HEWL の効果について調べた. その結果, 蛍光ラベルが結晶中での分子間相互作用部位にあるときは (正方晶系結晶と斜方晶系結晶), F-HEWL は強力な不純物として働くが, 蛍光ラベルが結晶中での分子間相互作用部位にないときは (単斜晶系結晶と三斜晶系結晶), 不純物効果は大変小さいことを明らかにした. そのため, 本研究においても, 正方晶系結晶を飽和溶液中に静置し, 結晶の成長が無視できる条件下では, F-HEWL 分子は溶質分子であるネイティブな HEWL 分子を十分良好に模擬していると考えられる.

4. タンパク質分子の拡散(8)

飽和溶液と HEWL 正方晶系結晶との界面で拡散する F-HEWL 分子を蛍光一分子観察した一例を図 5 に示す. 図中の点線より左側は HEWL の飽和溶液 (0.1 nM の F-HEWL を含む) を, そして点線より右側は正方晶系結晶の {110} 面を示す. 結晶表面上では多くの白い輝点と白いもやが観察されることが分かる. ここで, 個々の白い輝点は蛍光ラベル化した鶏卵白リゾチーム (F-HEWL) 1 分子に相当する. このことは次のようにして確かめられた. まず, 本実験条件下では F-HEWL は溶液中で凝集せず, 単分子状態で溶解していることを, 電気泳動法によって確認した. また, 図 2B に示したように, カバーガラス上で通常の蛍光一分子観察法によって, F-HEWL 分子を輝点として観察でき, 輝点の密度は調整した F-HEWL 濃度に応じて変化した. そして, カバーガラス上で観察されたのと全く同じ輝度で, 溶液-結晶界面でも蛍光の輝点を観察することが出来たことより, 個々の F-HEWL 分子を観察できていると結論づけた. また, 図 5 中の挿入図に示されているように, F-HEWL 分子は時間とともにその位置を変化させたことより, 溶液-結晶界面での拡散現象を観察できていることが分かる.

図 5 において, 左側の溶液中ではほとんど蛍光が観察されないのに対し, 結晶表面上では多くの白い輝点ともやが観察されることは, 大変興味ある現象を示す. すなわち, バルク溶液中では F-HEWL の 3 次元的な拡散運動は十分に速いために, 個々の F-HEWL 分子から発せられる蛍光を捉えることが出来なかった. 一方, 溶液と結晶との界面では個々の F-HEWL 分子を観察できたことは, 界面では F-HEWL の拡散挙動が溶液

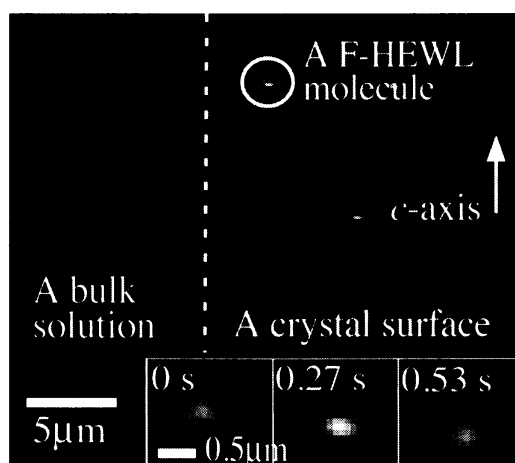


図 5 リゾチーム (HEWL) 飽和溶液と HEWL 正方晶系結晶 {100} 面の界面で直接観察した, 拡散する蛍光ラベル化リゾチーム (F-HEWL) 分子 (8). 輝点は 1 つの F-HEWL 分子を示す. 右下挿入図は拡散の様子を示す拡大図.

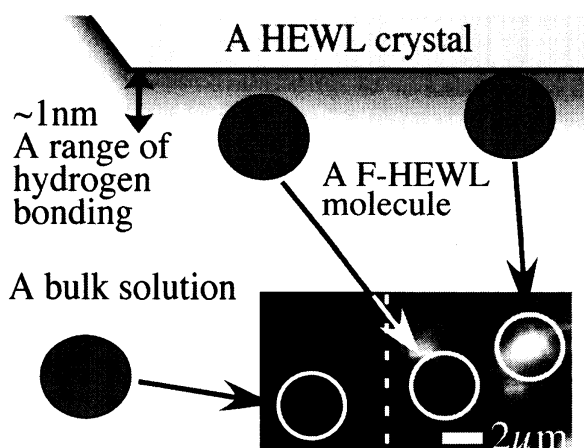


図 6 リゾチーム (HEWL) 結晶と溶液との界面の模式図 (8). 結晶表面からの引力相互作用に捉えられている蛍光ラベル化リゾチーム (F-HEWL) 分子は輝点として観察できる. しかし, 相互作用を弱くしか受けていない F-HEWL 分子はもやとして観察され, 相互作用を受けていない分子は観察できない.

中に比べて極端に遅いことを示す。すなわち、溶液-結晶界面からの強い引力を受けて、個々の F-HEWL 分子は結晶表面と強く相互作用していることが分かる。タンパク質分子同士の主な相互作用は水素結合であり、その到達距離はおよそ 1 nm 程度と見積もられる。そのため、図 6 に模式的に示したように、図 5 で観察できた分子は、結晶表面近傍の極薄い相互作用レイヤー中を極めて 2 次元的に拡散していることがわかる。このような拡散は、静電的相互作用が支配的な、親水的な結晶と水溶液との界面での拡散の一般的な描像を示していると予想される。一方、結晶表面の極めて薄い相互作用領域から外れかけた分子はより速く拡散するため、結晶表面上では白いもやとして観察された。

我々は、自家製のソフトウェア(11)を用いて、F-HEWL 分子の位置の経時変化を追跡した。F-HEWL 分子からの蛍光輝度分布をガウス分布を用いてフィッティングすることにより、図 5 の 1 ピクセルサイズ (87 nm) よりもずっと精度良く、F-HEWL の位置を決定した。ガラスに吸着した F-HEWL 分子の観察より求めた位置決め精度は ± 30 nm であった。図 7A は、33 ms ごとに追跡した、個々の F-HEWL 分子の軌跡を示す。図より、個々の F-HEWL 分子の 2 次元的な拡散を十分な精度で追跡できていることが分かる。本観察実験で用いた正方晶系結晶の表面は渦巻ステップではなく 2 次元アイランドで覆われていた。そのため、ステップ同士の平均の間隔は 5 μm よりも長かった。ステップ間隔が個々の分子の拡散する領域のサイズスケールよりも十分に大きいことより、図 7A はテラス上での拡散を捉えたものであると結論できる。

図 7B は、図 7A に示した分子 1~4 の 2 次元拡散の平均 2 乗変位 $\langle d(n\Delta t)^2 \rangle$ と拡散時間 $n\Delta t$ の関係を示す。4 つの分子

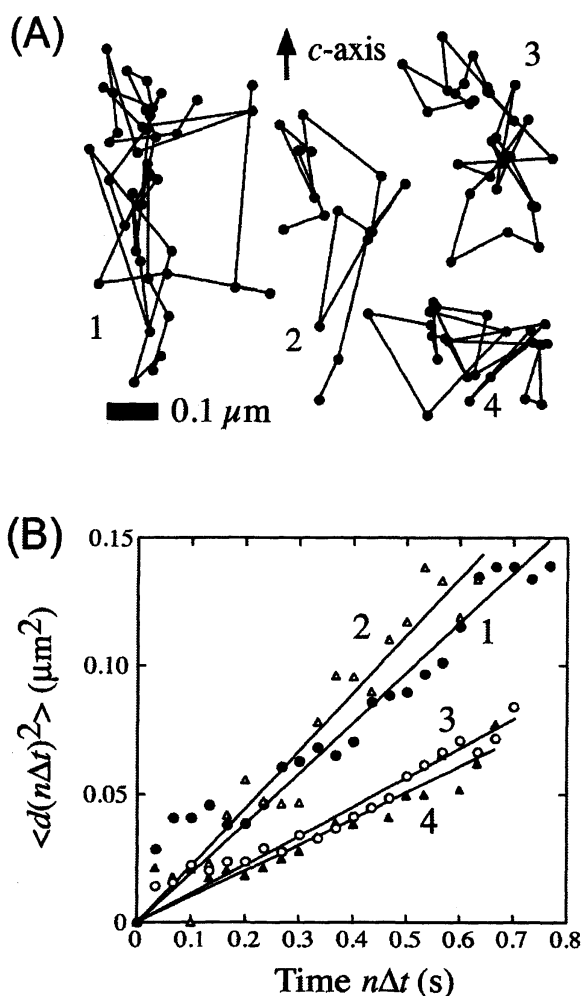


図 7 溶液と結晶との界面での個々の蛍光ラベル化リゾチーム (F-HEWL) 分子の拡散 (8). (A) 33 ms ごとの F-HEWL 分子の軌跡の追跡例. (B) 個々の分子の 2 次元での平均 2 乗変位と拡散時間の関係. (A) と (B) で同じ番号は同じ分子を示す.

共にそのプロットは直線で近似することが出来た。この結果は、溶液-結晶界面での拡散が単純なランダム拡散の描像で理解できることを示す。いくつかのプロットは直線から外れるようにも見えるが（例えば図 7B 中の分子 1 と 3）、観察した合計 293 分子中に明確な相関は見つけられなかった。そのため、単純なランダム拡散を仮定して解析を行った。

溶液-結晶界面での拡散係数 D を、 $n\Delta t = 1$ s の時の $\langle d(n\Delta t)^2 \rangle$ と、次式（2次元版のアインシュタインの式）

$$\langle d(n\Delta t)^2 \rangle = 4D \cdot n\Delta t \quad (1)$$

より求めた。293 分子について解析したところ、 $D = (6.9 \pm 1.2) \times 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ という結果が得られた。HEWL 分子のバルク水溶液中での拡散係数が $1.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ であることより(12), 溶液-結晶界面での拡散は溶液中での拡散に比べて 4-5 桁遅いことが分かった。この結果は、図 5 に示した、溶液中の拡散分子は観察できなかったが、溶液-結晶界面での拡散分子は明瞭に観察できた結果と良く一致する。

また我々が解析した、293 分子の界面での滞在時間の確率分布を図 8 に示す。図より確率分布は、滞在時間 0.47 ± 0.08 s に最大値を持つことがわかる（誤差はスチューデント T テストでの信頼性 95% の値を示す）。この滞在時間と拡散係数より求めた界面での F-HEWL 分子の拡散距離は $0.11 \text{ }\mu\text{m}$ であった。

溶液-結晶界面で観察された F-HEWL 分子の密度は $1.8 \times 10^{11} \text{ 1/m}^2$ であった。一方、バルク水溶液（0.1 nM）中に HEWL 1 分子厚み（3.5 nm）の層を仮想すると、この層内に存在する F-HEWL 分子の密度は $2.1 \times 10^8 \text{ 1/m}^2$ と求まる。この 3 桁もの密度の食い違いは、溶液-結晶界面では、結晶表面からの引力相互作用によって溶液中の F-HEWL 分子が界面に吸着し、著しく濃縮されることを示す。このような溶液-結晶界面での顕著な濃縮は本研究によって初めて見つけたものであり、溶液からの結晶成長のモデル化において、今後新たに考慮されねばならない。

以上述べたように、我々は、溶液-結晶界面において溶質分子を模擬した蛍光ラベル化分子の拡散挙動を直接光学観察することで、溶液と結晶との界面に固有な、

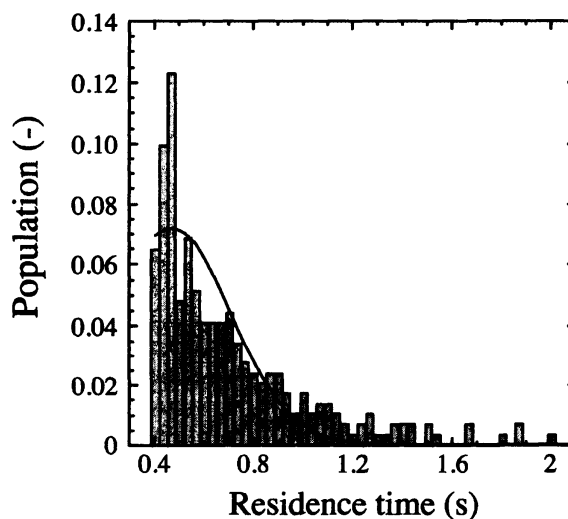


図 8 蛍光ラベル化リゾチーム (F-HEWL) 分子のリゾチーム (HEWL) 正方晶系結晶 {110} 面上での滞在時間の確率分布 (8). 合計 293 分子について解析した。図中の曲線はガウス分布でのフィッティング結果を示す。

2次元的な遅い拡散や、界面での濃縮など、特有な現象を見出すことが出来た。

5. タンパク質分子の吸着・脱離(9)

次に、我々は、ネイティブな HEWL の正方晶系結晶と飽和溶液との界面で、F-HEWL 分子が吸着・脱離する様子の直接観察に挑戦した。モデル実験系としては、拡散のその場観察と同様に、HEWL の正方晶系結晶と F-HEWL を用いた。

まず我々は、結晶表面上のどのような部位に F-HEWL 分子が吸着するのか、「吸着サイト」を明らかにしようと試みた。結晶が成長も溶解もしない飽和溶液 (0.1 nM F-HEWL を含む) に正方晶系結晶を加え、

20.0°Cで一晩静置した。そして、溶液-結晶界面の同一視野を、薄液層型の蛍光一分子観察法 (図 9A) およびレーザー共焦点微分干渉顕微法 (図 9B) を用いてその場観察した。前者の顕微法では溶液-結晶界面に吸着した個々の F-HEWL 分子を、そして後者の顕微法では結晶表面上の単位ステップ (図 1) を直接光学観察できる (13) (後者の顕微法はその後進化を続け、現在では結晶表面上の単分子 (14)・単原子 (15) 高さの単位ステップを、十分なコントラストで可視化出来る)。図 9A, B を見比べると、HEWL 結晶表面上にステップが観察される部位 (図 9B 白矢印) において、ステップに沿うように F-HEWL が存在することが分かる (図 9A 白矢印)。この結果は、F-HEWL 分子がステップに (より正確にはステップ上のキンクに) 吸着することを示す。この描像は、図 4 に示したように、F-HEWL 分子はステップに吸着するまでは、溶質であるネイティブの HEWL 分子と同様の振る舞いを示す、とする我々の仮定を強く指示する。

次に、溶液-結晶界面において吸着した分子と拡散している分子を見分けるために、同一視野を継続的に一分子観察し、一連の時間フレーム中に記録されている F-HEWL 分子の位置を比較した。我々の実験条件下では、個々の蛍光スポットは数ピクセルから 6 ピクセル程度までのサイズのガウス分布を示した (図 10C 中の挿入図)。スポットの中央の位置が、時間的に連続した異なるフレームで 1 ピクセルサイズ (87 nm) 以内で一致する場合には、そのような F-HEWL 分子はフレーム間の時間中、吸着位置を変えなかった、すなわち同一位置に吸着し続けていたと判断した。図 10A と B は、1 s

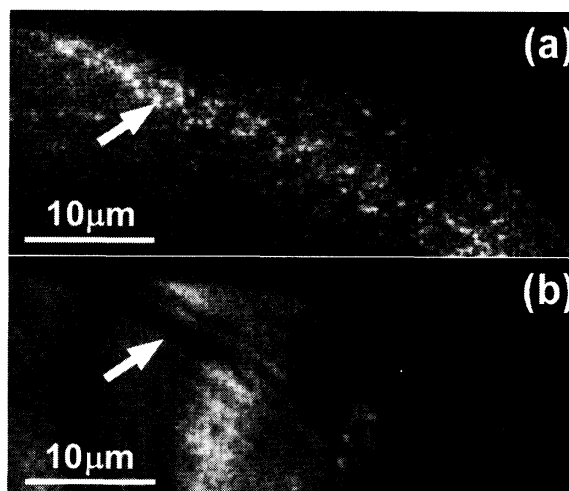


図 9 リゾチーム (HEWL) 正方晶系結晶の [110] 面上の同一視野を蛍光一分子観察法 (A) およびレーザー共焦点微分干渉顕微法 (B) でその場観察した結果 (9). 前者では結晶表面に吸着した蛍光ラベル化リゾチーム (F-HEWL) 分子を、そして後者では結晶表面上の単位ステップを直接観察できる

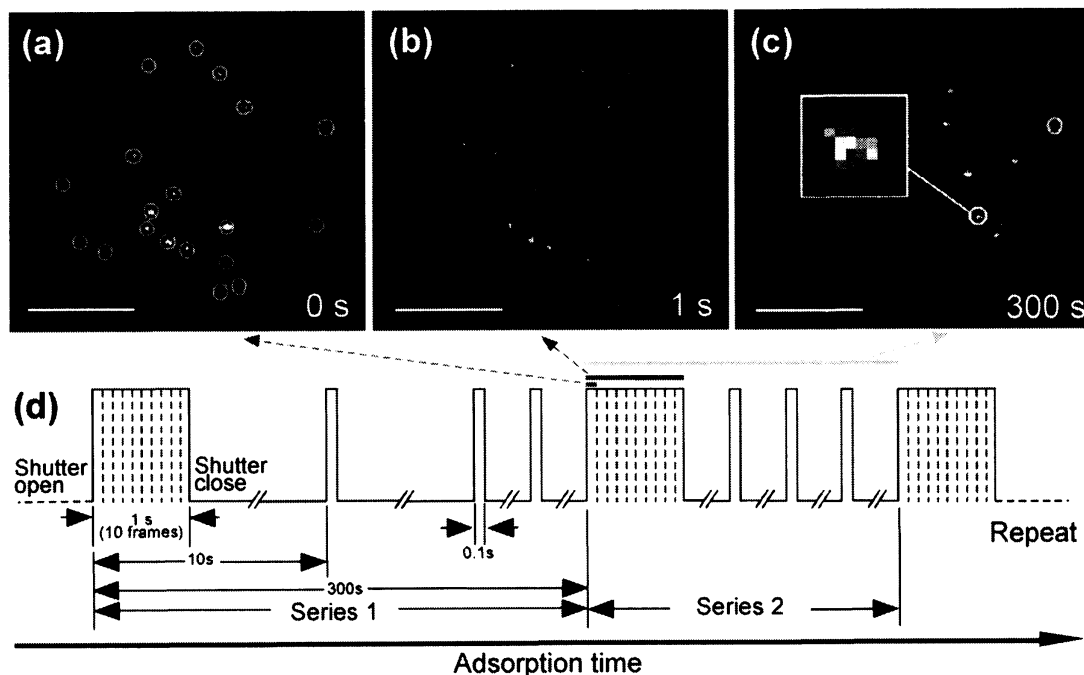


図 10 リゾチーム (HEWL) 結晶 [110] 面上での蛍光ラベル化リゾチーム (F-HEWL) 分子の吸着・脱離過程のその場観察 (9). (a)–(c) 同一視野の蛍光一分子観察像の経時変化. (a) 経過時間 61 min での観察例. 丸印は結晶表面上に観察された全 F-HEWL 分子を示す. (b) (a) の 1 s 後の像. 丸印は 1 s 間同一場所に吸着し続けていた分子を示す. (c) (a) の 300 s 後の像. 丸印は 300 s 間同一場所に吸着し続けていた分子を示す. (d) 励起用レーザー光による不連続照明のタイム・シーケンス.

間位置を変えなかった F-HEWL 分子の観察例を示す. 図 10A においては, 観察された全ての分子をマル印で示した. 一方, 図 10B では, マル印はその位置を 1 s 間変えなかった分子を示す. 本稿では以後, このような分子を「吸着した分子」と呼ぶ. 吸着した分子には「拡散している分子」は含まれない.

HEWL 飽和溶液中に含まれる F-HEWL の濃度は 0.1 nM と極度に薄く, かつ F-HEWL の溶液-結晶界面での拡散距離も 0.11 μm と十分に短い (8). そのため, 1 つの分子が結晶表面から脱離した後, 全く同じ位置に 2 つめの分子が新たに吸着するケースは, 極めてまれであり除外できる. 本稿では以降, 結晶表面で F-HEWL 分子がその位置を変えなかった時間間隔を「滞在時間 τ 」と定義する.

図 10C は, 図 10A を撮影してから 300 s 後に全く同じ場所を撮影した様子を示す. 図中のマル印は, 図 10A と C の間に位置を変えなかった, すなわち $\tau \geq 300$ s である F-HEWL 分子を示す. $\tau \geq 300$ s (図 10C) である分子の数は $\tau \geq 1$ s (図 10B) である分子の数に比べて極めて少ないことが分かる. この結果は, 滞在時間 1~300 s の間に, 吸着していた F-HEWL 分子が次々と脱離したことを示す. 図 10C 中のマル印でマークされていない F-HEWL 分子は, 図 10A が撮影された後に結晶表面に吸着した分子に相当する.

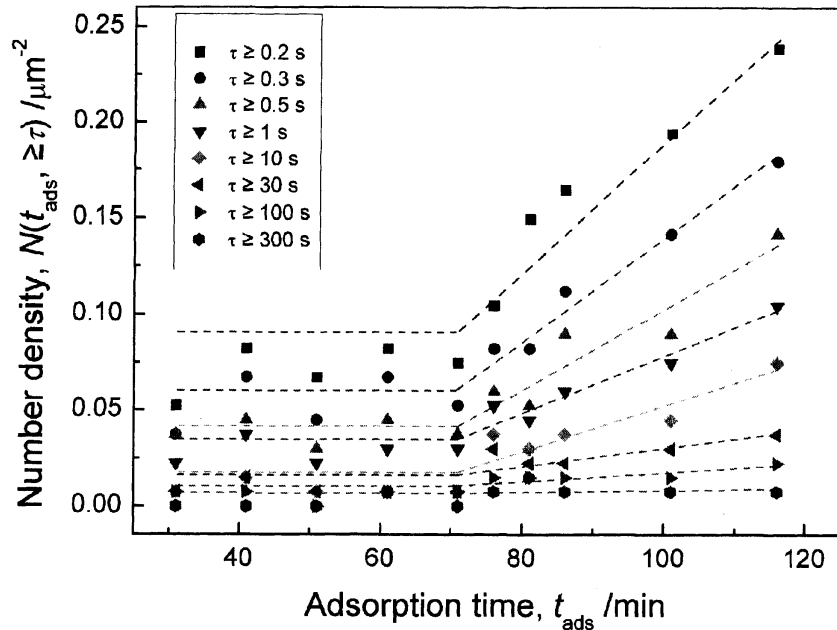


図 11 蛍光ラベル化リゾチーム (F-HEWL) の吸着密度 $N(t_{\text{ads}}, \geq \tau)$ の経過時間 t_{ads} 依存性 (9). 0.2–300 s の滞在時間 τ で解析した.

我々が用いた実験条件下では、HEWL にラベルした蛍光色素 TRITC の蛍光は、約 40 s で退色した。そのため、同じ溶液–結晶界面を連続的に長時間、励起光で照明することは出来ず、図 10D に示したように不連続に照明することで、総照明時間を 31 s におさえた。観察チャンバーに F-HEWL 分子を導入した後の経過時間を t_{ads} とする。経過時間 t_{ads} において、滞在時間 τ 以上のあいだ結晶表面に吸着し続けていた F-HEWL 分子の吸着密度 $N(t_{\text{ads}}, \geq \tau)$ を計測した。そのため、経過時間 t_{ads} から時間 τ 以内に新たに結晶表面に吸着した F-HEWL 分子は、吸着密度 $N(t_{\text{ads}}, \geq \tau)$ には含まれていない。

我々は、様々な滞在時間 τ における吸着密度 $N(t_{\text{ads}}, \geq \tau)$ を、経過時間 t_{ads} の関数として系統的に計測した。その結果、図 11 に示すように、滞在時間 τ によらずある誘導期間（約 70 min）を経た後に、 $N(t_{\text{ads}}, \geq \tau)$ が急に増加することが分かった。誘導期間後は、時間とともに $N(t_{\text{ads}}, \geq \tau)$ はほぼ直線的に増加した（図中の点線は直線近似の結果）。従来のラングミュア型吸着では、吸着量は吸着開始直後から時間とともに直線的に増加する。そのため、吸着に誘導期が存在するという我々が得た結果は、従来の吸着の概念とは大きく異なる。誘導期の存在は、吸着が一つの素過程のみで進行するのではないことを示す。もし吸着が 1 つの素過程のみで進むとすると、個々の分子が吸着の活性化エネルギー障壁を乗り越える確率は、分子が障壁を乗り越えようとトライした回数、すなわち経過時間 t_{ads} に比例する。しかし、実験結果はそうではなかった。図 11 に示した結果は、おそらく、吸着が「逐次的な複数の素過程」を経て進行することを示す。現在、我々は実験的な証拠を全く持ち合わせていないが、そのような逐

次的な複数の素過程としては、タンパク質分子の脱水和過程が最もありそうな候補ではないかと考えている。

さらに図 11 より、滞在時間 τ が増加するとともに、同じ経過時間 t_{ads} における $N(t_{ads}, \geq \tau)$ が急激に小さくなることが分かる。この結果は、滞在時間 τ が長い強い吸着は、滞在時間 τ が短い弱い吸着に比べてより起こりにくいことを示す。すなわち、結晶表面への分子の吸着は、何回ものトライを経て、徐々に強くなってゆくと考えられる。結晶表面への溶質分子の段階的な吸着は、溶質から固相へと相転移する過程において、オーダー・パラメータが徐々に変化することに対応すると考えられる。

以上のように、個々の分子の吸着を直接観察することで、従来の描像には当てはまらない溶液-結晶界面での吸着挙動を明らかにすることが出来た。この特異な吸着挙動は、通常のラングミュア型吸着の極初期過程に恐らく対応するのではないかと考えている。

6. おわりに

我々は、薄液層型の光学系を考案することで、溶液と結晶との界面で、蛍光一分子観察を行うことに成功した。そして、タンパク質結晶と蛍光ラベルしたタンパク質を用いて、「溶液-結晶界面」での溶質を模擬した分子の拡散と吸着・脱離の挙動を、世界に先駆けて直接観察した。その結果、拡散は結晶からの引力相互作用を受けうる極薄い層内で2次元的に進行すること、拡散はバルク溶液中に比べて4-5桁遅くなることなどを見出した。また、吸着には誘導期が存在することがわかった。

本稿で紹介した研究では、溶液と結晶は平衡状態にあったが、今後、過飽和を与えると拡散や吸着・脱離がどのように変化するか（またはしないか）、さらに検討をすすめたい。また、本観察システムと、個々の単位ステップをその場観察できるシステム(13, 14)を組み合わせることで、個々の分子の拡散・吸着・脱離とステップの前進との相関を直接観察することが可能となる。溶液からの結晶成長が、気相からの結晶成長とはどのようにちがうのか、その描像をさらに明らかにしたい。

謝辞

本稿で紹介した一連の研究は、著者が東北大学金属材料研究所に在職中に、東北大学学際科学国際研究センターにおいて、岡田雅史(当時・東北大学大学院理学研究科)、Dai Guoliang(中国科学院・力学研究所)、松井拓郎(当時・東北大学金属材料研究所)、Alexander Van Driessche(スペイン・グラナダ大学)、塚本勝男(東北大学大学院理学研究科)、中嶋一雄(当時・東北大学金属材料研究所)、樋口秀男(東京大学

大学院理学系研究科), 渡邊朋信 (理化学研究所生命システム研究センター) らの諸氏と行った共同研究の成果である. 以上の諸氏に心より感謝申し上げる. また, 本研究は, JSPS 科学研究費補助金 (課題番号 16360001, 17034007, 18360003) の助成を受けた.

引用文権

1. Sazaki G, *et al.* (2012) In Situ Observation of Elementary Growth Processes of Protein Crystals by Advanced Optical Microscopy. *Protein and Peptide Letters* 19(7):743-760.
2. Van Driessche AES, *et al.* (2008) Comparison of Different Experimental Techniques for the Measurement of Crystal Growth Kinetics. *Crystal Growth & Design* 8(12):4316-4323.
3. Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, Saito K, & Yanagida T (1995) Imaging of Single Fluorescent Molecules and Individual Atp Turnovers by Single Myosin Molecules in Aqueous-Solution. *Nature* 374(6522):555-559.
4. Sako Y & Uyemura T (2002) Total internal reflection fluorescence microscopy for single-molecule imaging in living cells. *Cell Structure and Function* 27(5):357-365.
5. Cognet L, Coussen F, Choquet D, & Lounis B (2002) Fluorescence microscopy of single autofluorescent proteins for cellular biology. *Comptes Rendus Physique* 3(5):645-656.
6. Wazawa T & Ueda M (2005) Total internal reflection fluorescence microscopy in single molecule nanobioscience. *Microscopy Techniques, Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, Vol 95, pp 77-106.
7. Kellermayer MSZ (2005) Visualizing and manipulating individual protein molecules. *Physiological Measurement* 26(4):R119-R153.
8. Sazaki G, *et al.* (2008) Single-molecule visualization of diffusion at the solution - Crystal interface. *Crystal Growth & Design* 8(6):2024-2031.
9. Dai GL, *et al.* (2011) Gradual Immobilization Processes of Molecules during Transitions from Solute to Solid States. *Crystal Growth & Design* 11(1):88-92.
10. Matsui T, *et al.* (2006) Impurity effects of lysozyme molecules specifically labeled with a fluorescent reagent on the crystallization of tetragonal and monoclinic lysozyme crystals. *Journal of Crystal Growth* 293(2):415-422.
11. Toba S, Watanabe TM, Yamaguchi-Okimoto L, Toyoshima YY, & Higuchi H (2006)

- Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(15):5741-5745.
12. Dubin SB, Clark NA, & Benedek GB (1971) *Journal of Chemical Physics* 54:5158-5164.
 13. Sazaki G, *et al.* (2004) In situ observation of elementary growth steps on the surface of protein crystals by laser confocal microscopy. *Journal of Crystal Growth* 262(1-4):536-542.
 14. Sazaki G, Zepeda S, Nakatsubo S, Yokoyama E, & Furukawa Y (2010) Elementary steps at the surface of ice crystals visualized by advanced optical microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(46):19702-19707.
 15. Wen R, Lahiri A, Azhagurajan M, Kobayashi S, & Itaya K (2010) A New in Situ Optical Microscope with Single Atomic Layer Resolution for Observation of Electrochemical Dissolution of Au(111). *Journal of the American Chemical Society* 132(39):13657-13659.